

9

COPOLYMER AND PRODUCTION THEREOF

Patent Number: JP63269989
Publication date: 1988-11-08
Inventor(s): DOI YOSHIHARU
Applicant(s): YOSHIHARU DOI
Requested Patent: ☐ JP63269989
Application Number: JP19870103228 19870428
Priority Number(s):
IPC Classification: C12P7/62
EC Classification:
Equivalents: JP1728448C, JP4012712B

Abstract

PURPOSE: To obtain a novel copolymer easily moldable by spinning, rolling, etc., and having high strength and stability, by culturing a microbial strain capable of producing poly-3-hydroxybutyrate in the presence of valeric acid.

CONSTITUTION: A microbial strain capable of producing poly-3-hydroxybutyrate (e.g. *Alcaligenes eutrophs* NCIB 11599) is cultured at about 20-40 deg.C and about pH6-10 under aerobic condition and microbial cells are separated from the culture liquid in the late logarithmic growth period. The cells are cultured in the presence of valeric acid, its derivative or their salt under controlled supply of nitrogen and/or phosphorus. A random copolymer composed of $\leq 50\text{mol}\%$ of D-(-)-3-hydroxybutyrate and $\geq 50\text{mol}\%$ of D-(-)-3-hydroxyvalerate can be separated from the microbial cell.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-269989

⑮ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)11月8日

C 12 P 7/62
// (C 12 P 7/62
C 12 R 1:05)

7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 共重合体およびその製造法

⑰ 特 願 昭62-103228

⑱ 出 願 昭62(1987)4月28日

⑲ 発 明 者 土 肥 義 治 神奈川県横浜市旭区今宿町2617-39

⑳ 出 願 人 土 肥 義 治 神奈川県横浜市旭区今宿町2617-39

明 細 書

製造法。

1. 発明の名称

共重合体およびその製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) D-(α)-3-ヒドロキシブチレートおよびD-(α)-3-ヒドロキシバリレートを含む、D-(α)-3-ヒドロキシブチレートが50モル%以下、D-(α)-3-ヒドロキシバリレートが50モル%以上のランダム共重合体である新規な共重合体。
- (2) ポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有する微生物を、前段で菌体を増殖させ、後段で該菌体を窒素もしくはりん制限下で培養して該菌体内にポリ-3-ヒドロキシブチレートを生成、蓄積させるに際して、後段で吉草酸もしくはその誘導体またはこれらの塩の存在下で培養し、菌体内にD-(α)-3-ヒドロキシブチレートおよびD-(α)-3-ヒドロキシバリレートを含有する共重合体を生成、蓄積させることを特徴とする共重合体の

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、D-(α)-3-ヒドロキシブチレート(以下 B成分 と記す)およびD-(α)-3-ヒドロキシバリレート(以下 V成分 と記す)を含有する共重合体およびその製造法に関し、さらに詳細には、B成分に対するV成分の割合(モル比)が大きい共重合体の製造法およびこの製造法で得られる新規な共重合体に係る。

(従来の技術、発明が解決しようとする問題点)

ポリ-3-ヒドロキシブチレート(PHB)は、エネルギー貯蔵物質として数多くの微生物の菌体内に蓄積され、優れた生物分解性と生体適合性を示す熱可塑性高分子であることから、環境を保全する“クリーン”プラスチックとして注目され、手術糸や骨折固定用材などの医用材料および医薬や農薬を徐々に放出する徐放性システムなどの多方面への応用が長年にわたり期待されてきた。特

に近年、合成プラスチックが環境汚染や資源循環の観点から深刻な社会問題となるに至り、PHBは石油に依存しないバイオポリマーとして注目されている。

しかしながら、PHBは耐衝撃性に劣るという物性上の問題とともに、生産コストが高いことから工業的生産が見送られてきた。

近時、B成分およびV成分を含有する共重合体およびその製造法について、研究、開発がなされ、たとえば、特開昭57-150393号公報および特開昭59-220192号公報にそれぞれ記載されている。

これらの公報のPHBの製造法は、従来のPHBの製造法におけると同様に、前段では菌体を増殖させ、後段では窒素またはりんを制限して微生物を培養し、共重合体を製造するものである。

しかしながら、前者では、後段の培養において基質として、たとえば、プロピオン酸およびイソ酪酸を使用することにより、B成分99.9~50モル%と、たとえば、V成分のような他のエステル成分0.1~50モル%を含む共重合体を製造するとの

記載がある。しかしながら、この公報においては、たとえば、実施例では最高33モル%のV成分を含む共重合体しか示されておらず、V成分がこれよりも多い共重合体は具体的には示されていない。

一方、後者では、後段の培養において、PHB抽出後の菌体の細胞物質からの炭素を使用して、少なくとも40モル%のB成分と他のエステル成分とを含む共重合体を製造するとの定性的な記載がある。しかしながら、この公報には、B成分とV成分との割合を具体的に示した共重合体は全く記載されていない。また、この方法は煩雑であり、かつ、細胞物質の成分は、培養条件などにより物質の種類、量などに大幅の変動があり不安定であって、実際のではない。

さらに、共重合体のV成分が0から33モル%まで増大すると、この増大に伴って融解温度(T_m)が180℃から85℃まで急激に低下することが知られており〔T.L. Bluhm et al, *Macromolecules* 19, 2871-2876(1986)〕、このことは、工業的には均一な製品を得ることが困難であることを意味して

いる。

(問題点を解決するための手段、作用)

本発明者は、B成分に対するV成分の割合(モル比)が比較的大きい共重合体を工業的に有利に、かつ、容易に製造すべく鋭意研鑽を重ねた結果、後段の窒素もしくはりんを制限する培養において、吉草酸の存在下でPHB生産能を有する微生物を培養すると、この菌体中にB成分に対するV成分の割合(モル比)が比較的大きい共重合体が生成、蓄積されとの新知見を得て、本発明に到達した。

すなわち、本発明は、D-(−)-3-ヒドロキシブチレートおよびD-(−)-3-ヒドロキシバレートを含むし、D-(−)-3-ヒドロキシブチレートが50モル%以下、D-(−)-3-ヒドロキシバレートが50モル%以上のランダム共重合体である新規な共重合体であり、また、ポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有する微生物を、前段で菌体を増殖させ、後段で該菌体を窒素もしくはりんを制限下で培養して該菌体内にポリ-3-ヒドロキシブチレートを生成、蓄積させるに際して、

後段で吉草酸もしくはその誘導体またはこれらの塩の存在下で培養し、菌体内にD-(−)-3-ヒドロキシブチレートおよびD-(−)-3-ヒドロキシバレートを含有する共重合体を生成、蓄積させることを特徴とする共重合体の製造法である。

本発明において、共重合体に含有されるB成分およびV成分はそれぞれ次の式で示される。すなわち、

B成分: $-\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CO}-$

V成分: $-\text{OCH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{CO}-$

本発明で使用される微生物は、PHB生産能を有する微生物であれば特に制限はないが、実用上は、たとえば、アルカリゲネス フエカリス (*Alcaligenes faecalis*)、アルカリゲネス ルーランドイ (*Alcaligenes ruhlandii*)、アルカリゲネス ラタス (*Alcaligenes latus*)、アルカリゲネス アクアマリヌス (*Alcaligenes aquamarinus*) およびアルカリゲネス ユウトロフス (*Alcaligenes eutrophs*) などがある。

これらの菌種に属する菌株の代表例として、ア

ルカリゲネス フェカリス ATCC 8750, アルカリゲネス ルーランディイ ATCC 15749, アルカリゲネス ラタス ATCC 29712, アルカリゲネス アクアマリヌス ATCC 14400 ならびにアルカリゲネス ユウトロフス H-16 ATCC 17699 およびこの H-16株の突然変異株であるアルカリゲネス ユウトロフス NCIB 11597, 同 NCIB 11598, 同 NCIB 11599, 同 NCIB 11600 などを挙げることができる。これらのうち、実用上、アルカリゲネス ユウトロフス H-16 ATCC 17699 およびアルカリゲネス ユウトロフス NCIB 11599 が特に好ましい。

アルカリゲネス属に属するこれらの微生物の菌学的性質は、たとえば、"BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY: Eighth Edition, The Williams & Wilkins Company/Baltimore" に、また、アルカリゲネス ユウトロフス H-16 の菌学的性質は、たとえば、"J. Gen. Microbiol., 115, 185~192(1979) にそれぞれ記載されている。

これらの微生物は、従来の方法と同様に、主と

ならびに無機成分としては、たとえば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、りん酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩、ニッケル塩、クロム塩、ほう素化合物およびよう素化合物などからそれぞれ選択される。

また、必要に応じて、ビタミン類なども使用することができる。

培養条件としては、温度は、たとえば、20~40℃程度、好ましくは25~35℃程度とされ、また、pHは、たとえば、6~10程度、好ましくは6.5~9.5程度とされる。このような条件で好氣的に培養する。

これらの条件をはずして培養した場合には、微生物の増殖は比較的悪くなるが、これらの条件をはずして培養することを妨げない。

培養方式は、回分培養または連続培養のいずれでもよい。

前段の培養によって得られた菌体を、さらに窒素および/またはりん制限条件下で培養する。

して菌体を増殖させる前段の培養と、窒素もしくはりんを制限して菌体内に共重合体を生成、蓄積させる後段の培養との2段で培養される。

前段の培養は、微生物を増殖させる為の通常の培養法を適用することができる。すなわち、使用する微生物が増殖し得る培地および培養条件を採用すればよい。

培地成分は、使用する微生物が同化し得る物質であれば特に制限はないが、実用上は、炭素源としては、たとえば、メタノール、エタノールおよび酢酸などの合成炭素源、二酸化炭素などの無機炭素源、酵母エキス、糖蜜、ペプトンおよび肉エキスなどの天然物、アラビノース、グルコース、マンノース、フラクトースおよびガラクトースなどの糖類ならびにソルビトール、マンニトールおよびイノシトールなど、窒素源としては、たとえば、アンモニア、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物および/または、たとえば、尿素、コーン・ステープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物

すなわち、前段の培養で得られた培養液から微生物の菌体を、濾過および遠心分離のような通常の固液分離手段により分離回収し、この菌体を後段の培養に付するか、または、前段の培養において、窒素および/またはりんを実質的に枯渇させて、菌体を分離回収することなく、この培養液を後段の培養に移行させることによってできる。

この後段の培養においては、培地または培養液に、窒素および/またはりんを実質的に含有させず、かつ、吉草酸、その誘導体もしくはこれらの塩（これらを総称して吉草酸類と記すこともある）を炭素源として含有させる以外には前段の培養と異なる処はない。

吉草酸およびその誘導体は、一般式



(ただし、式中、X は、水素原子、ハロゲン原子もしくはヒドロキシ基、Y は、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ基もしくはアルキル基を示す)で表わされ、この誘導体の代表例として、4-クロロ吉草酸、4-ヒドロキシ吉草酸、4-メチル吉草酸、

4-エチル吉草酸、5-ヒドロキシ吉草酸および5-クロロ吉草酸などを挙げることができる。吉草酸およびその誘導体のそれぞれの塩の代表例としてナトリウム塩およびカリウム塩などがある。

吉草酸類は、後段の培養における培地もしくは培養液に含有せしめられる。後者の場合には、培養の初期乃至終期のどの時点でもよいが、培養の初期が好ましい。

吉草酸類の使用量は、共重合体を生成させることができ、かつ、微生物の生育を阻害しないような量であればよく、使用した微生物の菌株および共重合体のB成分に対するV成分の所望の割合などによって異なるが、一般に、培地もしくは培養液の吉草酸類の濃度を高くするに伴って、共重合体のV成分の割合が大きくなる。たとえば、共重合体のV成分を50モル%以上とするためには、培地および培養液の吉草酸類の濃度は、通常は、培地もしくは培養液 1ℓあたり吉草酸として 5~40 g 程度、好ましくは10~30 g 程度とされる。

この後段の培養においては、吉草酸類を唯一の

炭素源としてもよいが、使用した微生物が資化し得る他の炭素源—たとえば、グルコース、フラクトース、メタノール、エタノール、酢酸、プロピオン酸、*n*-酪酸、および乳酸などを少量共存させることもできる。たとえば、グルコースを使用する場合には、多くても 1.5 g /ℓ程度とされる。

このように培養して得られた培養液から、濾過および遠心分離などの通常の固液分離手段によって菌体を分離回収し、この菌体を洗浄、乾燥して乾燥菌体を得、この乾燥菌体から、常法により、たとえば、クロロホルムのような有機溶剤で生成された共重合体を抽出し、この抽出液に、たとえば、ヘキサンのような貧溶媒を加えて、共重合体を沈殿させる。

本発明の製造法によって、共重合体のB成分に対するV成分の割合を任意に調節することができ、さらにB成分に対するV成分の割合が大きい共重合体を得られ、B成分が50モル%以下でV成分が50モル%以上の新規な共重合体さえも得ることができる。

本発明で得られた共重合体は、そのB成分に対するV成分の割合が比較的大きく、そのために融解温度は低下し、融解温度の安定性が大きくなり、かつ、結晶化度が小さくなるために、強度的に優れ、紡糸および圧延などの成形が、容易でしかも安定し、また、得られた繊維およびフィルムなどの成形品は、しなやかで、しかも強靱となる。

(実施例)

本発明を、実施例によりさらに具体的に説明する。なお、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

アルカリゲネス ユウトロフス NCIB 11599 を使用して共重合体を製造した。すなわち、

前段培養：

つぎの組成を有する培地で前記の微生物を30℃で24時間培養し、対数増殖期終期の培養液から遠心分離により菌体を分離した。

前段培養用培地の組成

酵母エキス	10 g	ポリペプトン	10 g
肉エキス	5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g

これらを脱イオン水 1ℓに溶解し、pH 7.0に調整した。

後段培養：

前段培養で得られた菌体を、つぎの組成を有する培地に、1ℓあたり 5 g の割合で懸濁させ30℃で48時間培養し、得られた培養液から遠心分離により菌体を分離して、菌体を得た。

後段培養用培地の組成

0.5M	りん酸水素カリウム水溶液	39.0 ml
0.5M	りん酸水素二カリウム水溶液	53.6 ml
20M/1VX	硫酸マグネシウム水溶液	1.0 ml

炭素源*

ミネラル溶液**	1.0 ml
----------	--------

* 炭素源としてつぎの割合で吉草酸および／またはグルコース (g /ℓ培地) を使用した。

	吉草酸	グルコース
①	20	0
②	20	0.5

③ 20 1.0

④ 0 20

**ミネラル溶液

CoCl₂ 119.0 mgFeCl₃ 9.7 gCaCl₂ 7.8 gNiCl₂ 118.0 mgCrCl₂ 62.2 mgCaSO₄ 156.4 mg

を0.1N-HCl 1ℓに溶解

これらを脱イオン水 1ℓに溶解し、pH 7.0に調整した。

菌体の処理：

後段培養で得られた菌体を蒸留水で洗浄し、引き続きアセトンで洗浄し、これを減圧乾燥（20℃、0.1mmHg）して乾燥菌体を得た。前記の①～④を使用した場合のそれぞれの乾燥菌体重量には実質的に差はなかった。

共重合体の分離回収：

このようにして得られた乾燥菌体から熱クロロ

ホルムで共重合体を抽出し、この抽出液にヘキサンを加えて共重合体を沈澱させ、この沈澱を濾取、乾燥して共重合体を得た。

共重合体の特性：

このようにして得られた共重合体の組成、固有粘度、融解温度および融解熱を、つぎのようにして測定した。すなわち、

組成 : ¹H NMRスペクトルによる。

固有粘度 (η) : 30℃, クロロホルム中。

融解温度 T_m : DSC測定による。

(昇温速度 10 °C/分)

融解熱 ΔH : DSC測定による。

測定結果などを第1表に示す。

なお、125MHz ¹³C NMR スペクトルを用いて①を使用した場合の共重合体の連鎖分布を求めた。

すなわち、本発明者およびその他らの方法 (Y. Doi et al, *Macromolecules*, 19, 2860-2864 (1986)) に従い、カルボニル炭素の多重線共鳴構造からBユニットおよびVユニットのダイアド連鎖分布を決定した。この共重合体はつぎの連鎖分布を持つ

ことがわかった。

B B (ブチレート-ブチレート) 連鎖 3%

B V (ブチレート-バリレート) および

V B (バリレート-ブチレート) 連鎖 12%

V V (バリレート-バリレート) 連鎖 85%

この連鎖分布は、共重合体がランダム共重合連鎖分布を持つことを示している。

実施例 2

アルカリゲネス ユウトロフス H-16 ATCC 17699
を使用し、炭素源として吉草酸 20 g /ℓ培地を使用した他は実施例 1 と同様に行った。

結果を第1表に示す。

(以下余白)

第1表

実施例	①	②	③	④	2
乾燥菌体重量 (g)	36	24	17	54	38
組成 (%)					
B成分	10	27	39	100	34
V成分	90	73	61	0	66
固有粘度 (dl · g ⁻¹)	4.0	2.7	2.0	4.4	2.0
平均分子量 (×10 ³)	5.7	3.5	2.4	6.4	2.4
融解温度 (°C)	108	106	104	178	104
融解熱 (cal/g)	13.8	9.9	6.9	21.7	8.4

(発明の効果)

本発明の製造法によってB成分に対するV成分の割合が大きい共重合体が容易に、かつ、効率よく得られ、しかも、新規な共重合体さえも得ることができる。

さらに、本発明で得られた共重合体は、優れた種々の特性を有しているので、手術糸および骨折固定用材などの医用材料の原料として極めて好適であり、また、徐放性システムへの利用などの多方面への応用が期待される。

特許出願人 土 肥 義 治

平成 1. 5. 10 発行

特許法第17条の2の規定による補正の掲載

手続補正書 (自発)

昭和 62 年特許願第 103228 号 (特開 昭 63-269989 号, 昭和 63 年 11 月 8 日 発行 公開特許公報 63-2700 号掲載) については特許法第17条の2の規定による補正があったので下記のとおり掲載する。 1 (1)

平成 1 年 2 月 2 日

特許庁長官 殿

Int. Cl. 1	識別記号	庁内整理番号
C12P 7/62 /(C12P 7/62 C12R 1:05)		7236-4B

1. 事件の表示

昭和 62 年 特許願 第 103228 号

2. 発明の名称

共重合体およびその製造法

3. 補正をする者

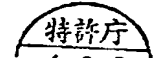
事件との関係 特許出願人

住所 (〒241) 神奈川県横浜市旭区今宿町 2617-39

氏名 土 肥 義 治 (土肥)

4. 補正の対象

明細書の「特許請求の範囲」の欄および「発明の詳細な説明」の欄



5. 補正の内容

I. 特許請求の範囲を別紙のとおり補正する。

II. 明細書をつぎのとおり補正する。

- (1) 第 5 頁下から第 8 行「ートを含むし、」と「D-(-)-3-ヒドロキシブチレート」との間に「D-(-)-3-ヒドロキシブチレートと D-(-)-3-ヒドロキシバリレートとの合計に対して」を挿入する。
- (2) 第 5 頁下から第 7 行「以下」を削除して「より低く」を挿入する。
- (3) 第 5 頁下から第 6 行「以上の」を削除して「より高い」を挿入する。
- (4) 第 6 頁下から第 2 行「eutrophs)」を削除し「eutrophus)」を挿入する。

別紙

特許請求の範囲

- (1) D-(-)-3-ヒドロキシブチレートおよび D-(-)-3-ヒドロキシバリレートを含むし、D-(-)-3-ヒドロキシブチレートと D-(-)-3-ヒドロキシバリレートとの合計に対して D-(-)-3-ヒドロキシブチレートが 50 モル% より低く、D-(-)-3-ヒドロキシバリレートが 50 モル% より高いランダム共重合体である新規な共重合体。
- (2) ポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有する微生物を、前段で菌体を増殖させ、後段で該菌体を窒素もしくはりんの間隙下で培養して該菌体内にポリ-3-ヒドロキシブチレートを生成、蓄積させるに際して、後段で吉草酸もしくはその誘導体またはこれらの塩の存在下で培養し、菌体内に D-(-)-3-ヒドロキシブチレートおよび D-(-)-3-ヒドロキシバリレートを含有する共重合体を生成、蓄積させることを特徴とする共重合体の製造法。

-/-
(75)

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)